

高效凝胶过滤色谱填料 KH-s-GFC300 的合成与评价

赵 睿, 李新会, 刘国诠

(中国科学院化学研究所分子科学中心, 北京 100080)

摘要 以碱溶法制备的高孔隙度硅胶为基质, 与 γ -环氧丙基丙氧基三甲氧基硅烷配基进行共价键合, 经过酸性水解, 使其转化为二醇基, 制成了高效亲水凝胶色谱填料。键合反应中采用 70 °C 回流冷凝管, 使生成的甲醇可顺利地排到体系外, 促使反应向有利于键合的方向进行, 以获得较高的配基密度。研究表明, 水解反应条件与配基密度以及柱效密切相关。当配基密度为 2.6 ~ 3.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 时, 才能显示出较高的柱效。蛋白质分离实验结果显示, 此填料的相对分子质量排阻极限为 300 000, 牛血清白蛋白的回收率为 99%。

关键词 高效凝胶过滤色谱填料 高孔隙度硅胶 二醇基 蛋白质分离

中图分类号 O658 **文献标识码** A **文章编号** 1000-8713(2005)06-0619-03

Synthesis and Evaluation of High Performance Gel Filtration Chromatography Packing of KH-s-GFC300

ZHAO Rui, LI Xinhui, LIU Guoquan

(Center for Molecular Science, Institute of Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract : A novel packing for high performance gel filtration chromatography (GFC) was synthesized and characterized. High porosity silica prepared by base-dissolving method was used as the matrix. γ -(2,3-Epoxy propoxyl) propyltrimethoxysilane was used as the ligand and covalently bonded onto the silica matrix. After acidic hydrolysis, the epoxy groups were converted to the diol groups. Because a condensation tube filled with water at 70 °C was used in the grafting reaction, the resulting methanol could easily be discharged from the reaction system to shift the reaction equilibrium to achieve high ligand density. The hydrolysis condition greatly affects ligand density and column efficiency. The high column efficiency is observed when the ligand density is between 2.6 and 3.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. Several proteins, such as cytochrome C, chymotrypsin, ovalbumin, bovine serum albumin, aldolase, ferritin, insulin, γ -globulin, phosphorylase, actin, carbonic anhydrase, were used to characterize the separation properties of the resulting high performance GFC column. It was shown that the excluded limit of relative molecular mass for the separation of bio-molecules was 300 000. The recovery yield of bovine serum albumin was 99%.

Key words : packing for high performance gel filtration chromatography ; high porosity silica ; diol group ; protein separation

凝胶过滤色谱填料的特点是生物相容性好、回收率高、且能够按照相对分子质量的大小对蛋白质进行富集、分级和纯化。随着生物技术的高速发展, 昂贵的生物工程产品对分离纯化技术的要求越来越高, 凝胶过滤色谱本身的特点使其非常适合于生物工程产品的需要。凝胶色谱始自 1959 年 Porath 等合成葡聚糖凝胶^[1], 随后, 聚丙烯酰胺凝胶^[2]、琼脂糖凝胶^[3]等相继出现, 它们在生物、医药等领域中得到了广泛的应用。与此同时, 这些有机凝胶质软、

机械强度低等缺点也逐渐暴露出来。无机基质亲水凝胶的出现^[4~6]弥补了它的不足。无机凝胶填料机械强度高, 粒径小, 可达到较高的柱效。因而, 高效亲水凝胶色谱迅速发展起来, 一些著名的商品化高效凝胶色谱柱, 如 TSK-SW 系列等旋即进入了市场, 并获得了广泛的应用^[7~9]。

以硅胶为基质的高效亲水凝胶色谱填料多以甘油醚基(即二醇基)进行硅胶的表面修饰^[4], 氨基、咪唑基、尿素及取代尿素等也可作为其亲水基

团^[10]为提高其表面的亲水性和生物相容性,文献[8]将葡聚糖接枝在硅胶表面,以分离蛋白质;但使用最广泛的仍然是二醇基,这与二醇基填料合成简单且生物相容性好等特点不无关系。本文以碱溶法制备的高孔隙度硅胶^[11]为基质,以二醇基为配基,合成了高效亲水凝胶过滤色谱填料 KH-s-GFC300,并对其进行了评价。

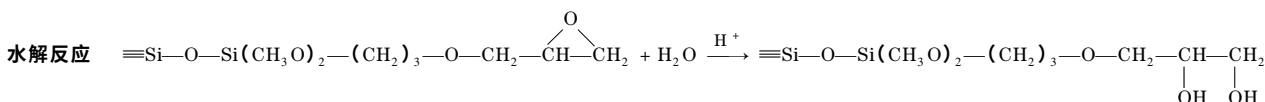
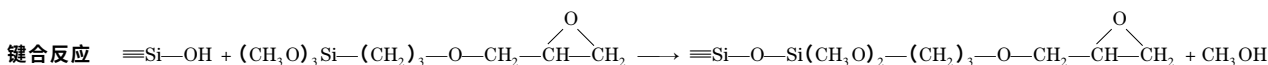
1 实验部分

1.1 材料与试剂

球形多孔硅胶为本实验室自制,粒径 4~7 μm、比孔容 1.4~2.4 cm³/g、孔径 10~20 nm;γ-环氧丙基丙氧基三甲氧基硅烷(KH-560)(辽宁盖县化工厂)硫酸、氢氟酸、氢氧化钠、金属钠、甲苯和丙酮,均为分析纯(北京化工厂);二硝基苯丙氨酸、细胞色素 C、胰凝乳蛋白酶、卵清蛋白、醛缩酶、铁蛋白购自 Serva Feinbiochemica;胰岛素、γ-球蛋白以及相对分子质量低的标准蛋白(磷酸化酶、牛血清白蛋白(BSA)、肌动蛋白、碳酸酐酶和烟草花叶病毒外壳蛋白)购自中国科学院上海生物化学研究所;蓝葡聚糖来源于 Pharmacia。

1.2 配基的键合

取球形多孔硅胶 30 g,以体积分数为 0.2% 的氢氟酸处理 24 h,洗净,于 120 ℃干燥 4 h。将干燥后的硅胶装入 500 mL 三颈瓶中,于 100 ℃下真空干燥 2 h,真空下通过分液漏斗向三颈瓶内加入含 10 mL KH-560 并以金属钠干燥过的甲苯 300 mL,然后向体系中通入氮气,并在氮气保护下搅拌、加热至甲苯回流。三颈瓶上装有一球形冷凝管,其中通



这一键合反应可以在水相中进行,也可在有机溶剂相中进行^[9]。本文采用有机溶剂法进行键合,键合反应中生成的甲醇通过 70 ℃回流冷凝管排出体系外,促使反应向利于键合的方向进行。考察了不同反应时间(3,5,7,9,15,24,30 h)键合的配基密度,结果分别为 1.8,2.2,2.6,3.2,4.7,6.0,6.1 μmol/m²。说明随着反应时间的延长,配基密度逐渐增加,至 24 h 后,反应基本达到平衡,配基密度达到 6.0 μmol/m²。通常,硅胶表面硅羟基的密度约为 8.0 μmol/m²,因此,6.0 μmol/m² 即相当于 75% 左右的硅羟基已被修饰。这是水相键合方法所难以达到的^[9]。

70 ℃热水。加热反应至一定时间后,停止反应。将键合好的硅胶过滤,以甲苯和丙酮洗净、烘干,待用。

1.3 环氧基的水解

合成装置与键合时所用的装置相同。于真空下向装有键合硅胶的三颈瓶中加入 pH 3.0 的酸性水溶液,于 90 ℃下搅拌水解 1~3 h,过滤,以水洗至中性,然后在真空烘箱内于 60~70 ℃烘干,待用。

1.4 色谱柱的填充

将该亲水凝胶色谱填料采用匀浆法装填于 500 mm×8 mm i. d. 的不锈钢色谱柱中,匀浆液为甲醇,装柱压力为 29.4 MPa(300 kg/cm²)。

1.5 键合相的表征及评价

以元素分析法测定键合硅胶的 C 含量,据此计算出单位质量键合硅胶的配基密度(μmol/g),再依据所使用基质硅胶的比表面积(m²/g),计算出单位比表面积上的配基密度(μmol/m²)。按亲水凝胶色谱方式评价该填料,流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(内含 0.15 mol/L KCl,pH 6.8),恒溶剂洗脱,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 280 nm。

2 结果与讨论

2.1 配基的键合

以硅胶为基质的色谱填料因表面游离的硅羟基具有弱阳离子交换作用,对极性化合物和离子型化合物都有一定的非特异性吸附,所以不能直接用作多肽和蛋白质分离分析用的凝胶过滤色谱填料,需要键合亲水官能团才能成为亲水性凝胶过滤色谱填料。在亲水凝胶色谱中,多选用硅烷化试剂作为配基进行修饰,以产生亲水性的二醇基,其反应如下:

2.2 环氧基的水解开环

环氧基具有较高的反应活性,必须进行水解才能形成亲水的、稳定的二醇基。环氧基的水解既可在酸性条件下,亦可在碱性条件下进行^[12]。考虑到化学键合硅胶稳定的范围是 pH 2~8,故采用酸性水解较为安全。选用 90 ℃作为水解温度,以 pH 3.0 的硫酸水溶液进行水解,考察了不同水解时间(0,1.5,2.0,2.5,3 h)对硅胶表面配基密度的影响,结果分别为 6,3,2.2,1.9,1.7 μmol/m²。说明随着水解时间的延长,配基密度降低,表明在水解过程中会产生断链,即配基会因 Si—C 键的断裂而脱落。当水解 3 h 后,配基密度仅相当于水解前密度的

28% 左右。所以,水解反应时间不能过长,一般以 1~2 h (pH 3, 90 ℃) 为宜。这一点从所制备填料的色谱行为上也可以得到印证。水解不充分的填料,表现出较强的疏水性,使蛋白质的回收率降低。兼顾环氧基的水解并保留尽可能高的配基密度,是优化水解条件的原则。

研究表明,当配基密度为 $2.6 \sim 3.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 时,柱效为 37 000~45 000 理论塔板/m,显示出较高的柱效。

2.3 蛋白质的凝胶色谱分离

选择所制备的粒径 $7 \mu\text{m}$ 、平均孔径 18 nm 、比孔容 $1.83 \text{ cm}^3/\text{g}$ 、比表面积 $162 \text{ m}^2/\text{g}$ 、配基表面平均密度为 $3.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 的高效凝胶过滤色谱填料 (KH-s-GFC300) 填充至色谱柱中。以二硝基苯丙氨酸、胰岛素、细胞色素 C、胰凝乳蛋白酶、卵清蛋白、牛血清白蛋白、 γ -球蛋白、醛缩酶、铁蛋白和蓝葡聚糖为样品,对其进行了评价。各样品的相对分子质量及淋洗曲线见图 1。

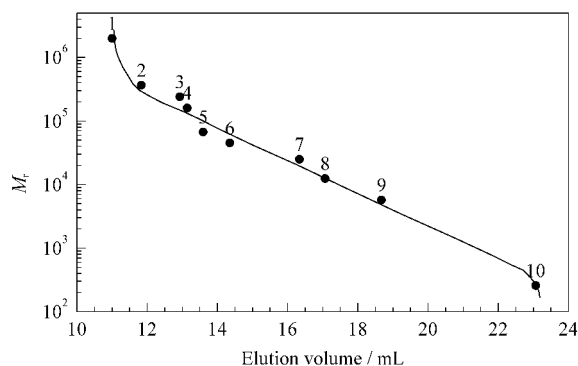


图 1 不同蛋白质在 KH-s-GFC300 柱上的淋洗曲线
Fig.1 Calibration graph of proteins on KH-s-GFC300 column

Column size: $500 \text{ mm} \times 8 \text{ mm i. d.}$; mobile phase: 0.05 mol/L phosphate buffer + 0.15 mol/L KCl , pH 6.8; flow rate: 1.0 mL/min ; detection: UV 280 nm.

1. dextran blue (M_r 2 000 000) 2. ferritin (M_r 364 000) ; 3. aldolase (M_r 240 000) ; 4. γ -globulin (M_r 150 000) ; 5. ovalbumin (M_r 45 000) ; 6. bovine serum albumin (M_r 67 000) ; 7. chymotrypsin (M_r 25 000) ; 8. cytochrome C (M_r 12 400) ; 9. insulin (M_r 5 700) ; 10. 2,4-dinitro phenylalanine (M_r 255.2).

从图 1 可知,此色谱柱的排除极限约为 300 000。经测定,其凝胶颗粒间的体积 $V_0 = 10.8 \text{ mL}$,凝胶内孔体积 $V_i = 12.4 \text{ mL}$,故此色谱柱的固液相比 $V_i/V_0 = 1.15$,与商品化的凝胶色谱柱相当。以二硝基苯丙氨酸为样品,测定其柱效为 38 000 理论塔板/m,以 BSA 为样品,测定其柱效为 6 300 理论塔板/m。根据 Hagel 公式^[9],可计算出此色谱柱的最大峰容量为 19。图 2-a 给出了 BSA 的色谱图,按文献[10]的方法测定 BSA 的回收率为 99%,表明在

所选定的实验条件下,该柱对蛋白质具有较小的非特异性吸附。图 2-b 为混合标准蛋白质的色谱图,可以看出,5 种标准蛋白质获得了分离。而采用未经碱处理的硅胶制备的高效凝胶过滤色谱填料,5 种标准蛋白质的混合物只能观察到两个峰。

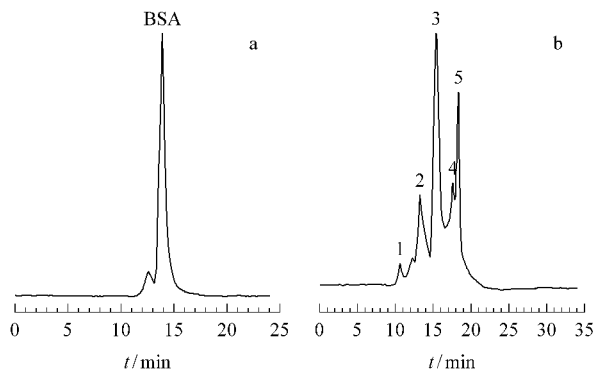


图 2 BSA (a) 和标准蛋白质混合物 (b) 在 KH-s-GFC300 柱上的色谱分离图

Fig.2 Chromatograms of BSA solution (a) and a mixture of standard proteins (b) on KH-s-GFC300 column

Peaks: 1. phosphorylase; 2. BSA; 3. actin; 4. carbonic anhydrase; 5. coat protein of tobacco mosaic virus.

以二硝基苯丙氨酸、胰凝乳蛋白酶、牛血清白蛋白和醛缩酶为样品,考察了流速为 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0 mL/min 时对柱压和柱效的影响。结果表明,当流速为 1.0 mL/min 时,柱压为 7.0 MPa ;随着流速升高至 2.0 mL/min ,柱压呈线性升高,但未引起柱效的明显降低。此外,当装柱压力为 30 MPa 时,亦未造成色谱填料结构的改变,故此色谱填料表现出了很好的机械强度和稳定性。究其原因,可能与它的基质制备方法有关,化学侵蚀法有利于硅胶整体的稳定性,从而可保持较高的抗压能力。

参考文献:

- [1] Porath J, Flodin P. Nature, 1959, 183:1657
- [2] Hjerten S, Mosbach R. Anal Biochem, 1962, 3:109
- [3] Hjerten S. Arch Biochem Biophys, 1962, 99:466
- [4] Haller W. Nature, 1965, 206:693
- [5] Hashimoto T, Sasaki H, Aiura M, Kato Y. J Chromatogr A, 1978, 160:301
- [6] Eksteen R, Pardue K J. Chromatogr Sci Ser, 1995, 69:47
- [7] Wang Y M, Wang S R, Tsai I H. Biochem J, 2001, 354:161
- [8] Petro M, Gemeiner P, Berek D. J Chromatogr A, 1994, 665:37
- [9] Porsch B. J Chromatogr A, 1993, 653:1
- [10] Pannkoch E, Lu K C, Regnier F E, Barth H G. J Chromatogr Sci, 1980, 18(9):430
- [11] Zhao Rui, Li Xinhui, Liu Guoquan. Chinese Journal of Chromatography (赵睿, 李新会, 刘国詮. 色谱), 2005, 23(6):616
- [12] Bogart G R, Leyden D E, Wade T M, Schafer W, Carr P W. J Chromatogr A, 1989, 483:209